

Cytochrom P450 Monoxygenasen aus thermophilen Bakterien

Patent number: DE10051175
Publication date: 2002-05-02
Inventor: SCHMID ROLF (DE); HAUER BERNHARD (DE); MERKL RAINER (DE); BLASCO FRANCESCA (DE)
Applicant: BASF AG (DE)
Classification:
- **international:** C12N9/02; C12N15/53; C07H21/04; C12N15/63;
C12N1/00; C12P1/00
- **european:** C12N9/02L15; C12P1/04
Application number: DE20001051175 20001016
Priority number(s): DE20001051175 20001016

Also published as:

WO0233057 (A3)



WO0233057 (A2)



CA2425927 (A1)

Abstract of DE10051175

The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ **Offenlegungsschrift**
⑯ **DE 100 51 175 A 1**

⑯ Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/02
C 12 N 15/53
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 P 1/00

⑯ Aktenzeichen: 100 51 175.9
⑯ Anmeldetag: 16. 10. 2000
⑯ Offenlegungstag: 2. 5. 2002

DE 100 51 175 A 1

⑯ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE
⑯ Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

⑯ Erfinder:
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE;
Schmid, Rolf, Prof. Dr., 70329 Stuttgart, DE; Merkl,
Rainer, Dr., 37120 Bovenden, DE; Blasco, Francesca,
73734 Esslingen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Cytochrom P450 Monoxygenasen aus thermophilen Bakterien
⑯ Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monoxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monoxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

DE 100 51 175 A 1

DE 100 51 175 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

5 [0002] Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen die Fähigkeit technisch interessante Oxygenierungsreaktionen zu katalysieren und werden daher seit einiger Zeit intensiv untersucht. So wurde beispielsweise die Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* isoliert und charakterisiert und ist mittlerweile auf rekombinantern Weg zugänglich (vgl. z. B. DE-A-199 35 115).

10 [0003] Diese Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome.

15 [0004] Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Durch gezielte Einführung von Punktmutationen ist es zwischenzeitlich gelungen, das Substratspektrum dieses Enzyms zu erweitern. So können nunmehr auch kürzer als auch längerkettige Carbonsäuren, Alkane, Alkene, Cycloalkane, Cycloalkene und verschiedene Aromaten durch dieses Enzym oxidiert werden (vgl. DE-A-199 35 115, 199 55 605, 100 11 723 und 100 14 085).

20 [0005] Um die industrielle Anwendbarkeit dieser Enzymklasse weiter zu verbessern, wäre es daher wünschenswert neue Cytochrom P450-Monooxygenasen zu finden, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind, wie z. B. Enzyme mit erhöhter thermischer Stabilität.

25 [0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind.

[0007] Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 30 gemäß SEQ ID NO: 2 und vorzugsweise außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.

[0008] Erfindungsgemäß bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenasen weisen eine Aminosäuresequenz auf, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäure aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO: 2 vorgegebenen Sequenzbereichen.

35 [0009] Eine besonders bevorzugte Cytochrom P450 Monooxygenase besitzt eine Aminosäuresequenz, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

[0010] Erfindungsgemäß Cytochrom P450 Monooxygenasen sind insbesondere aus thermophilen Bakterien, vorzugsweise der Gattung *Thermus* sp., wie z. B. der Spezies *Thermus thermophilus*, Stamm HB27 (hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM7039) isolierbar. "Thermophile" Bakterien erfüllen erfindungsgemäß die Temperaturtoleranzkriterien nach H. G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage, Seite 173, für thermophile und extrem thermophile Organismen (d. h. Wachstumsoptimum bei über 40°C).

40 [0011] Die erfindungsgemäßen Monooxygenase sind vorzugsweise durch eine erhöhte Temperaturstabilität gekennzeichnet. Diese drückt sich in einem in Vergleich zum P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* geringeren Aktivitätsverlust bei erhöhter Temperatur (z. B. in einem Bereich von 30 bis 60°C, pH 7,5, 25 mM Tris/HCl) aus.

45 [0012] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Oligonukleotide, welche mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren, die für eine erfindungsgemäß Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.

[0013] Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung auch solche Oligonukleotide, welche eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 30 bis 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO: 1.

50 [0014] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition hybridisieren und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren, insbesondere eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus anderen Mikroorganismen, wie z. B. solchen der Gattung *Thermus* sp.

[0015] Gegenstand der Erfindung sind insbesondere auch Polynukleotide, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition kodieren, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.

55 [0016] Bevorzugte Polynukleotide sind solche, die im wesentlichen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzen, sowie die dazu komplementären und davon abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen.

[0017] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskassetten zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Monooxygenasen, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit wenigstens einer der oben angegebenen Polynukleotide.

60 [0018] Weiter Gegenstände der Erfindung betreffen rekombinanter Vektoren, welche wenigstens ein Polynukleotid oder wenigstens eine Expressionskassette gemäß obiger Definition tragen; sowie Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen solchen rekombinanten Vektor; sowie Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Cytochrom P450 Monooxygenasen, bei welchen man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.

65 [0019] Die erfindungsgemäßen Enzyme und davon ableitbaren Mutanten sind als Biokatalysatoren für unterschiedliche biochemische Oxygenierungsreaktionen organischer Verbindungen von technischer Bedeutung brauchbar. In analoger Weise sind auch die erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismen zur Durchführung solcher Oxygenierungen.

DE 100 51 175 A 1

rungsreaktionen einsetzbar.

[0020] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase umsetzt.

[0021] Vorzugsweise wird dieses Verfahren so durchgeführt, dass man

5

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und gegebenenfalls einem Elektronendonator, kultiviert; oder
- 10 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, mit einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

[0022] Das exogene oder intermediär gebildete Substrat kann dabei ausgewählt sein unter:

15

- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- 20 d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und.
- e) aliphatischen, vorzugsweise terminal gesättigten, Carbonsäuren.

20

[0023] Nach einer ersten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

25

[0024] Nach einer zweiten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zu und führt die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durch, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten (Elektronendonator) enthält.

30

[0025] Obige Verfahren können bevorzugt in Bioreaktoren durchgeführt werden. Gegenstand der Erfindung sind daher solche Bioreaktoren, umfassend wenigstens eine erfindungsgemäße Monooxygenase oder wenigstens einen rekombinanten Mikroorganismus, gegebenenfalls jeweils in immobilisierter Form.

35

[0026] Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, eines Vektors oder eines Mikroorganismus gemäß vorliegender Erfindung zur mikrobiologischen Oxidation oben genannter organischer Verbindungsklassen.

[0027] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

40

[0028] Fig. 1 einen Sequenzvergleich von P450 aus *Thermus thermophilus* mit der Häm-Domäne von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. Doppelt unterstrichen ist dabei die Häm-Bindungsstelle gezeigt (Cys400 in P450 BM3 ist der Cysteinrest, der mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe koordiniert). Einfach unterstrichen ist die Region die in Kontakt steht mit dem ω -Ende der Fettsäurekette. Die Grad der Übereinstimmung ist durch verschiedenen Symbole gekennzeichnet ("*" – identische Reste; ":" und "." = ähnliche Reste).

45

[0029] Fig. 2 zeigt das Ergebnis eines Vergleichstests zur Bestimmung der Thermostabilität von P450 BM3 und P450 aus *Thermus* sp.. Die Thermostabilität wurde spektrometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500 nm über den Häm-Gruppen-Gehalt bestimmt.

50

[0030] Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls "funktionale Äquivalente" der konkret offenbarten neuen P450 Monooxygenasen.

55

[0031] "Funktionale Äquivalente" oder Analoga der konkret offenbarten Monooxygenasen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Enzyme, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreaktionen a) bis e) besitzen und/oder im Vergleich zu P450 BM3 eine erhöhte Thermostabilität, z. B. bei Temperaturen im Bereich von etwa 30 bis 60°C und gegebenenfalls höheren Temperaturen nach 30-minütiger Behandlung in 25 mM Tris/HCl, besitzen.

60

[0032] Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmust er zwischen Mutante und unverändertem Enzym qualitativ übereinstimmen, d. h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

65

[0033] "Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenasen, welche aus anderen Organismen, z. B. aus anderen als den hierin konkret genannten Bakterien, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

65

[0034] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-he-

DE 100 51 175 A 1

terocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen z. B. zwei oder drei vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder funfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z. B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z. B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromatene, wie 15 Acridin, und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

[0035] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z. B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl, oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroatome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

[0036] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt werden n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z. B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

[0037] Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopentan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten.

35 Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach substituiert sein und z. B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nichtlimitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie α -, β - und γ -Ionon, sowie die entsprechenden Methylionone und Isomethylionone.

[0038] Erfindungsgemäß oxidierbare, Substrate der Gruppe e) sind geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte C₈-C₃₀-Carbonsäuren, insbesondere Monocarbonsäuren, oder Carbonsäurederivate davon, wie Ester und Amide. Als Beispiele sind terminal oder subterminal (ω -1-, ω -2- oder ω -3-Position) hydroxylierbare gesättigte Monocarbonsäuren zu nennen.

[0039] Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen), kodierend für eine der obigen Monooxygenasen und deren funktionalen Äquivalenten. Weitere erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Eigenschaftsprofil.

[0040] Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eins speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z. B. Spleißvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d. h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

[0041] Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäß Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

60 [0042] Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide "hybridisieren" zu können, versteht man die Fähigkeit eines Polynukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70–100%, vorzugsweise zu 90–100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50–70°C, vorzugsweise 60–65°C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1 × SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20 × SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander ge-

bunden.

[0043] Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

5

[0044] Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird.

10

[0045] Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

15

[0046] Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z. B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_rP_i-Promotor.

20

[0047] Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

25

[0048] Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

30

[0049] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

35

[0050] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monoxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

40

[0051] Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

45

[0052] Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retriviale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

50

[0053] Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

55

[0054] Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z. B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch ent-

60

65

DE 100 51 175 A 1

sprechende Antibiotikaenthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

5 [0055] Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder μ oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

10 [0056] Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

15 [0057] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfundungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

20 [0058] Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

25 [0059] Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und das Enzym nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

30 [0060] Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

35 [0061] Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N. Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

40 [0062] Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

45 [0063] Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen obigen Typs.

50 [0064] Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zuerst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z. B. TB- oder LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20°C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zeldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promoters. Die Kultivierung wird nach Induktion der Monooxygenaseproduktion in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

55 [0065] Wird die erfundungsgemäße Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfundungsgemäße Enzym in einem exogenen Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10°C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z. B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

60 [0066] Beim erfundungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

[0067] Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z. B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

[0068] Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

Allgemeine experimentelle Angaben

65

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

[0069] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z. B. Restriktionsspaltun-

DE 100 51 175 A 1

gen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a. a. O. beschrieben durchgeführt.

5

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

[0070] PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:
8 µl dNTP-Mix (200 µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl₂, 8 µl MgCl₂ (25 mM, je 1 µl Primer (0,1 µM), 1 µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

10

c) Kultivierung von *E. coli*

[0071] Die Kultivierung von rekombinanten *E. coli*-Stämme DH5 α wurde in LB-Amp Medium (Trypton 10,0 g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H₂O ad 1000 ml) bei 37°C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inkuliert. Die Induktion der P450-Expression in *E. coli* erfolgte nach Erreichen eines OD578-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42°C.

15

20

d) Zellaufschluß

[0072] Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g *E. coli* DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumprophosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20%) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 mm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert, wobei man einen Rohextrakt erhält.

25

30

Beispiel 1

Klonierung und Expression von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 und den His-tag-Derivaten davon

1. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27

35

[0073] Die kodierende P450-Sequenz (blunt ended) wurde in die HincII-Schnittstelle des Plasmids pTZ19R (MBI Fermentas) einkloniert.

[0074] Aus dem so erhaltenen Plasmid TTHB66 wurde die kodierende P450-Sequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

40

a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450-ATG-Startcodons:

5 ' -CGAAGCT**CATATG**AAGCGCCTTCCCTGAG (SEQ ID NO: 7) . 45

b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stopcodons:

5 ' -GC**GAATT**CACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO: 8) . 50

[0075] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI-Schnittstellen des Vektors pCYTEXP1 (Plasmid mit dem temperaturinduzierbaren P_RP_L-Promotorsystem des Bakteriophagen λ (Belev T. N., et al., Plasmid (1991) 26: 147)) kloniert und in *E. coli* DH-5 α (Clontech, Heidelberg) transformiert.

55

[0076] *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

60

65

DE 100 51 175 A 1

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 [μ M]	Konzentration
4	0,092	0,056	
8	0,176	0,106	
24	0,106	0,064	

2. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit N-terminalem His-tag

15 [0077] Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

(a) 50-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-codons und die tag-codierenden Codons (unterstrichen):

20 5'-CGAAGCTCATATGCATCACCATCATCACACAAGCGCCTTTC (SEQ ID NO: 9);

(b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons:

25 5'-GCGGAATTCACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO: 8).

[0078] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 kloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

30 [0079] *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid, wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 [μ M]	Konzentration
4	ND	ND	
8	0,097	0,073	
24	0,111	0,073	

3. Clonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit C-terminalem His-tag

50 [0080] Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

(a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-Codons:

55 5'-CGAAGCTCATATGAAGGCCCTTCCTGAG (SEQ ID NO: 7)

(b) 47-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons sowie die unterstrichene tag-codierende Teilsequenz:

60 5'-CGGAATTCAGTGATGATGGTGTGCGCCCGCACCTCCTC (SEQ ID NO: 10)

[0081] Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CXTEXP1 kloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

65 [0082] *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37°C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehal-

DE 100 51 175 A 1

tes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	ND	ND
8	0,1	0,075
24	ND	ND

5

10

15

Beispiel 2

Bestimmung der Thermostabilität von P450 aus *Thermus thermophilus* im Vergleich zu P450 BM3

[0083] Die beiden Enzyme wurden jeweils 30 Minuten in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25 mM bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend abgekühlt und die P450 Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt und in Fig. 2 graphisch dargestellt.

20

Temperatur [°C]		30	40	50	60
P450 Konzentration [%]	P450 <i>thermus</i>	100	89	29	22
	P450 BM3	92	63	0	0

25

30

[0084] Wie man den Versuchsergebnissen entnimmt, besitzt das erfundungsgemäße Enzym nach 30-minütiger Inkubation bei allen Temperaturen eine signifikant höherer Temperaturstabilität.

35

40

45

50

55

60

65

DE 100 51 175 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Neue thermophile Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/41524

<140>

10 <141>

<160> 10

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

20 <213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1170)

25

<400> 1

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc 48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
1 5 10 15

30

cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc 96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
20 25 30

35

cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac 144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
35 40 45

40

ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc 192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
50 55 60

45

acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc 240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
65 70 75 80

50

acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac 288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
85 90 95

55

ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag 336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
100 105 110

60

gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg 384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
115 120 125

65

gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc 432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
130 135 140

65

ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc 480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala

DE 100 51 175 A 1

145	150	155	160	
ctg gac cg _g atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	165	170	175	528
				5
ctg gcc g _{cc} gaa gcc cgc ttc c _{gg} aag gac c _{gg} g _{gg} gcc ctc tac cgc Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	180	185	190	576
				10
gag g _{cg} gaa gcc ctc atc gtc c _{ac} c _{cc} ctc tcc c _{ac} c _{tt} c _{cc} cga Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	195	200	205	624
				15
gag cgc gcc ctg agc g _{ag} gcc g _{tg} acc ctc ctg g _{tg} g _{cg} g _{gc} c _{ac} g _{ag} Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	210	215	220	672
acg g _{tg} g _{cg} agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc c _{ac} cgc Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg	225	230	235	720
				20
ccg gac tgg c _{ag} aag c _{gg} g _{tg} g _{cc} g _{ag} agc g _{ag} g _{ag} g _{cg} g _{cc} ctc g _{cc} Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala	245	250	255	768
				25
gcc ttc c _{ag} g _{ag} g _{cc} ctg agg ctc tac ccc ccc g _{cc} tgg atc ctc acc Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr	260	265	270	816
				30
cg _g agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg g _{ga} g _{ag} g _{ac} c _{gg} ctc ccc c _{cg} Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro	275	280	285	864
				35
ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac g _{tg} acc c _{ag} c _{gg} ctc c _{ac} ttc Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe	290	295	300	912
				40
ccc gat g _{gg} g _{ag} g _{cc} ttc c _{gg} ccc g _{ag} c _{gc} ttc ctg g _{ag} g _{aa} agg g _{gg} Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly	305	310	315	960
				45
acc cct tcg g _{gg} c _{gc} tac ttc ccc ttt g _{gc} ctg g _{gg} c _{ag} agg ctc tgc Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys	325	330	335	1008
ctg g _{gg} c _{gg} g _{ac} ttc gcc ctc gag g _{gc} ccc atc gtc ctc agg gcc Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala	340	345	350	1056
				50
ttc ttc c _{gc} c _{gc} ttc c _{gc} c _{ta} g _{ac} ccc ctc ccc ttc ccc c _{gg} g _{tc} ctc Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu	355	360	365	1104
				55
gcc c _{ag} g _{tc} acc ctg agg ccc g _{aa} g _{gc} g _{gg} c _{tt} ccc g _{cg} c _{gg} c _{ct} agg Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg	370	375	380	1152
				60
gag g _{ag} g _{tg} c _{gg} g _{cg} t _{ga} Glu Glu Val Arg Ala	385	390		1170
				65

DE 100 51 175 A 1

5 <210> 2
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> *Thermus thermophilus*

10 <400> 2
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

15 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

20 Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

25 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

30 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

35 Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

40 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

45 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

50 Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140

55 Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 145 150 155 160

60 Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

65 Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
 180 185 190

70 Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
 195 200 205

75 Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
 210 215 220

80 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Ser His Arg
 225 230 235 240

85 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
 245 250 255

90 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
 260 265 270

95 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 275 280 285

100 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

DE 100 51 175 A 1

Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly				
305	310	315	320	
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys				5
325	330	335		
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala				
340	345	350		10
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu				
355	360	365		
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg				15
370	375	380		
Glu Glu Val Arg Ala				
385				20
<210> 3				
<211> 1188				25
<212> DNA				
<213> Künstliche Sequenz				
<220>				
<221> misc_feature				30
<222> (4)..(21)				
<223> His tag				
<220>				
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal				35
his tagged				
<220>				
<221> CDS				40
<222> (1)..(1188)				
<400> 3				
atg cat cac cat cat cac aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg				48
Met His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp				
1	5	10	15	45
ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg				96
Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala				
20	25	30		50
tgg ggc cgg gcc cac ccc cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc				144
Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro				
35	40	45		55
ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc				192
Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala				
50	55	60		
gag ggg acc acc aag gcc acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc				240
Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu				
65	70	75	80	60
acg ggg agg ggc ctc ctc acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg				288
Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala				
85	90	95		65

DE 100 51 175 A 1

5	cgc aag gcc ctc aaa gac ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr 100 105 110	336
10	cgg gag gcc atg gag gag gag gcc cggttccggggagttggcg Arg Glu Ala Met Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg 115 120 125	384
15	ggg gag gag cgg gac ctg gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg 130 135 140	432
20	ctc ctc ggg cgg gcc ctc ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala 145 150 155 160	480
25	gag cac gcc ctt aag gcc ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser 165 170 175	528
30	ccc ctg gcc ctc ctg gac ctg gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp 180 185 190	576
35	cggttccgtcgccctc tac cgc gag ggc gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro 195 200 205	624
40	ctc tcc cac ctt ccc cga gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu 210 215 220	672
45	ctg gtg gcg ggc cac gag acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe 225 230 235 240	720
50	ctc ctc ctc tcc cac cgc ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser 245 250 255	768
55	gag gag gcg gcc ctc gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc Glu Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro 260 265 270	816
60	ccc gcc tgg atc ctc acc ccg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Gly 275 280 285	864
65	gag gac ccg ctc ccc ccg ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val 290 295 300	912
70	acc cag agg ctc cac ttc ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg 305 310 315 320	960
75	ttc ctg gag gaa agg ggg acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc Phe Leu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly 325 330 335	1008
80	ctg ggg cag agg ctc tgc ctg ggg ccg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly 340 345 350	1056

DE 100 51 175 A 1

ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc	1104		
Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu			
355	360	365	
		5	
ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg	1152		
Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly			
370	375	380	
		10	
ctt ccc gcg cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga	1188		
Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala			
385	390	395	
		15	
<210> 4			
<211> 395			
<212> PRT			
<213> Künstliche Sequenz			
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal		20	
his tagged			
<400> 4			
Met His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp			
1	5	10	15
			25
Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala			
20	25	30	
			30
Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro			
35	40	45	
Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala			
50	55	60	
			35
Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu			
65	70	75	80
Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala			
85	90	95	
			40
Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr			
100	105	110	
			45
Arg Glu Ala Met Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg			
115	120	125	
Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg			
130	135	140	
			50
Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala			
145	150	155	160
			55
Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser			
165	170	175	
Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp			
180	185	190	
			60
Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro			
195	200	205	
			65
Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu			
210	215	220	

DE 100 51 175 A 1

Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
 225 230 235 240

5 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
 245 250 255

Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
 260 265 270

10 Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
 275 280 285

15 Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
 290 295 300

Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
 305 310 315 320

20 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
 325 330 335

25 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
 340 345 350

Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
 355 360 365

30 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
 370 375 380

35 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
 385 390 395

<210> 5
 40 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1168)..(1185)
 <223> His tag

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
 His-tagged

<220>
 55 <221> CDS
 <222> (1)..(1188)

<400> 5
 60 atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc 48
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

65 cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc 96
 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

DE 100 51 175 A 1

cggttccttccctgtcccggttcctgtccgtatctttgac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35 40 45	
cccgaggggtggaggggctccgtccgtggaccaccaaagcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	
accttcagttacggcccttcgtccgtacggaggggcccttc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	
accgacggggaaagctggagggcccgcaagggccctcaaa	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	
cccttcctgccgaaacgtccgtcgtacggggagggccatggag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
gaggcccggttcggggagttggcgggggagggccgtctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
gaccacgatgttcgtccgtccgtggccgttcaatggcc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	
ttcgggaaacccttcgtccgtccgtggccgttcaatggcc	480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala	
145 150 155 160	
ctggacggatcgttcgtccgtggccgttcaatggcc	528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
ctggccgaagcccggttcggaaaggtccgtccgtccgtcc	576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	
180 185 190	
gaggccgaaaccatcgtccgtccgtccgtccgtccgtcc	624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	
195 200 205	
gaggccgtcgtccgtggaccgtccgtccgtggccgtccgtcc	672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	
210 215 220	
acgggtggccgtccgtccgtccgtccgtccgtccgtccgtcc	720
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Ser His Arg	
225 230 235 240	
ccggacgttgcggaaagggtggccgtccgtggccgtccgtcc	768
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala	
245 250 255	
gcctttcaggtggccgtccgtggccgtccgtccgtccgtcc	816
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr	
260 265 270	
cgaggctggaaaggcccttcgtggaggtccgtccgtccgtcc	864
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro	
275 280 285	

DE 100 51 175 A 1

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc	912
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe	
290	295
300	
5 ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg	960
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly	
305	310
315	320
10 acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc	1008
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys	
325	330
335	
15 ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc	1056
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala	
340	345
350	
20 ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc	1104
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu	
355	360
365	
25 gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg	1152
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg	
370	375
380	
30 gag gag gtg cgg gcg cat cac cat cat cat cac tga	1188
Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His His	
385	390
395	
35 <210> 6	
<211> 395	
<212> PRT	
<213> Künstliche Sequenz	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal	
His-tagged	
40 <400> 6	
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu	
1	5
10	
15	
45 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro	
20	25
30	
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35	40
45	
50 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50	55
60	60
55 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65	70
75	
80	
65 Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85	90
95	
60 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100	105
110	
65 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115	120
125	
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	

DE 100 51 175 A 1

130	135	140	
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala			
145	150	155	160
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp			5
165	170	175	
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg			10
180	185	190	
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg			15
195	200	205	
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu			
210	215	220	
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Ser His Arg			20
225	230	235	240
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala			
245	250	255	
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr			
260	265	270	
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro			30
275	280	285	
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe			
290	295	300	
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly			35
305	310	315	320
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys			
325	330	335	
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala			
340	345	350	
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu			45
355	360	365	
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg			
370	375	380	
Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His			50
385	390	395	
<210> 7			55
<211> 30			
<212> DNA			60
<213> Künstliche Sequenz			
<220>			
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer			65
<400> 7			
cgaagctcat atgaagcgcc tttccctgag			30

DE 100 51 175 A 1

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
5 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

10 <400> 8
gcgaattcac gcccccacct cctccctagg 30

15 <210> 9
<211> 42
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9
cgaagctcat atgcatcacc atcatcatca caaggcctt tc 42
25

30 <210> 10
<211> 42
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

35 <400> 10
cggaattcag tgatgatgat ggtgatgcgc ccgcacacctcc tc 42

40 Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.
2. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.
- 45 3. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO: 2 vorgegebenen Sequenzbereichen.
- 50 4. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.
5. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche aus Bakterien der Gattung *Thermus* sp..
6. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 5, aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus*.
- 55 7. Oligonukleotid, welches mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisiert, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
8. Oligonukleotid nach Anspruch 7, welches eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO: 1.
- 60 9. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 7 oder 8 hybridisiert und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.
10. Polynukleotid, das für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.
- 65 11. Polynukleotid nach Anspruch 10 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, sowie die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz.
12. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11.
13. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 oder eine Expressionskas-

DE 100 51 175 A 1

sette gemäß Anspruch 12 trägt.

14. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 13.

15. Verfahren zur Herstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.

16. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umsetzt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man

a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, kultiviert; oder

a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter

a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen armotischen Verbindungen;

b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und

e) aliphatischen (terminal gesättigten) Carbonsäuren.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20 und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

21. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in immobilisierter Form.

22. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6, eines Vektors nach Anspruch 13, oder eines Mikroorganismus 14 zur mikrobiologischen Oxidation von

a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen armotischen Verbindungen;

b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen/und oder

e) aliphatischen Carbonsäuren.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

□	TIKEMPQPKTFGELKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKE	60
P450 BM3		
□	-MKRLSLRERAWPYLKDLQQD----PLAVLLAWGRAHPRFLPLPRLFPLALIFDPE-GVEG	54
P450 thermus		
P450 BM3	ACDESRFDKNLSQLKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMV	120
P450 thermus	ALLAEGTTKATFQYRALSR-LTGRGLLTDWG--ESWKEARKALKDPFLPKNVRGYREAME	111
P450 BM3	DIAVQLVQKWERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVRA	180
P450 thermus	EEARAFFGEWR---GEERDLDHEMIALSIRLLGRALFGKPLSPSLAEH-----ALKA	160
P450 BM3	LDEAMNKLQRANPDDPAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKAASGEQSDDLTHMLNG	240
P450 thermus	LDRIMAQTR--SPLALLDLAAEARFR-----K--DRGALYREAEALIVHPPLS	204
P450 BM3	KDPETGEPLDDENIRYQIITFLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVD	300
P450 thermus	HLP-----RERALSEAVTLLVAGHETVASALTWSFLLLSHRPDWQKRVAESEEALAA	257
P450 BM3	PVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLIPQL	360
P450 thermus	-----FQEALRLYPPAWILTRRLERPLLLG-EDRLPPG-TTLVLSPYV	298
P450 BM3	HRDKTIWGDDVEEFRPERFENPSAIPQHAFKPF GN ORACIGOO FA HEATLVLGMMKH	420
P450 thermus	TQRLHFP--DGEAFRPERFLEERGTPSGRYFPFGLQRLCLGRDFALLEGPIVLRAFFRR	356
P450 BM3	FDFEDHTNYELDIKETTLKPEGFVVKA SK KIPLGGIPS-PSTEQSAKKVR	471
P450 thermus	FRLDPLP--FPRVLAQVTLRPE-----GGLPARPREEVRA---	389

Fig.2

